



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

LARISSA DE SOUSA SATIRO

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS PARA FERMENTAÇÃO E PRESENTES NA
MICROFAUNA DO ABACAXI CULTIVADO NA PARAÍBA**

CAMPINA GRANDE - PB

2021

LARISSA DE SOUSA SATIRO

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES NA MICROFAUNA DO ABACAXI
CULTIVADO NA PARAÍBA PARA FERMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias/ Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder

CAMPINA GRANDE

2021

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S253s Sático, Larissa de Sousa.

Seleção de leveduras presentes na microfauna do abacaxi cultivado na Paraíba para fermentação [manuscrito] / Larissa de Sousa Sático. - 2021.

58 p.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2021.

"Orientação : Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder , Departamento de Agroecologia e Agropecuária - CCAA."

1. Fermentação alcoólica. 2. Abacaxi. 3. Tecnologia de bebidas. I. Título

21. ed. CDD 663.13

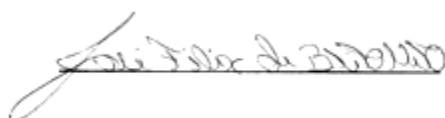
SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES NA MICROFAUNA DO ABACAXI CULTIVADO NA PARAÍBA PARA FERMENTAÇÃO

LARISSA DE SOUSA SATIRO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias/ Área de Concentração: Biotecnologia e Melhoramento vegetal.

Aprovada em 05 de abril de 2021

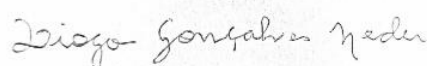
Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Félix de Brito Neto



Prof. Dr. Franciscleudo Bezerra da Costa



Prof. Dr Diogo Gonçalves Neder

Orientador

Ao meu filho Ryan, que está sendo gerado em meu ventre, Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela força e coragem de sempre querer ir em busca de mais conhecimentos.

À minha família, por serem a base do que sou, por me transmitirem os princípios necessário ao meu desenvolvimento pessoal e pelo apoio incondicional em cada etapa da minha vida.

À meu esposo, Joelson, pela parceria, paciência e por ser meu maior incentivador.

Aos meus amigos, parceiros de trabalho, de formação, de caminhada, que me acompanham em cada degrau alcançado.

Aos nobres companheiros de laboratório, Djailton, Yuri, Samara e Gabriela pelo apoio fundamental na condução desse trabalho. Por compartilhar as alegrias e dificuldades que são inerentes a todo trabalho de pesquisa.

Ao meu orientador, Diogo Neder, pelos ensinamentos passados e por ser um guia em cada etapa desenvolvida.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Objetivo geral.....	12
1.2 Objetivos específicos.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Abacaxi.....	13
2.2 Leveduras.....	16
2.3 Fermentação alcoólica.....	18
2.4 Fatores que afetam a fermentação.....	20
2.4.1 Etanol.....	20
2.4.2 Temperatura.....	21
2.4.3 Altas concentrações de glicose.....	21
2.4.4 Ph.....	21
2.5 Fermentação de frutas.....	22
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 Localização da pesquisa.....	23
3.1.1 Obtenção do fruto e fermentação espontânea.....	23
3.1.2 Meios de cultivo.....	23
3.2 Isolamento.....	24
3.3 Teste de exclusão por estresse.....	25
3.3.1 Testes da capacidade fermentativa de glicose.....	25
3.3.2 Teste de tolerância a etanol.....	26
3.3.3 Detecção de produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S).....	26
3.3.4 Crescimento em diferentes temperaturas.....	27
3.3.5 Teste de tolerância a altas concentrações de glicose.....	27
3.3.6 Fermentação do suco de abacaxi.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ranking da produção mundial de abacaxi no ano de 2017, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO).....	14
Tabela 2. Produção de abacaxi no Brasil no ano de 2018, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).....	15
Tabela 3. Classificação das leituras de capacidade fermentativa de glicose.....	26
Tabela 4. Número de colônias isoladas em cada tempo de fermentação.....	29
Tabela 5. Produção de sulfeto de hidrogênio pelas cepas identificadas no experimento.....	33
Tabela 6. Tolerância das cepas ao etanol.....	34
Tabela 7. Teste de resistência à altas temperaturas.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivar de abacaxi pérola.....	13
Figura 2. Produção do abacaxi na Paraíba.....	16
Figura 3. Esquema simplificado da glicólise e fermentação, evidenciando a conversão de glicose em etanol.....	19
Figura 4. Fluxograma de fermentação espontânea e isolamento em abacaxis.....	25
Figura 5. Fluxograma de processamento e fermentação de vinho de abacaxi.....	28
Figura 6. Leitura do teste de fermentação de glicose. Da esquerda para a direita: resultado negativo, resultado +1, resultado +2 e resultado +3.....	31
Figura 7. Comportamento fermentativo das cepas isoladas do abacaxi submetidas ao teste de fermentação de glicose.....	32
Figura 8. Teste de tolerância das cepas a 50% de glicose.....	37
Figura 9. Valores de pH e °brix durante a microvinificação em laboratório.....	38
Figura 10 – Dia 01 da microvinificação. Evidenciando a sedimentação e aparecimento de duas fases na LA19.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CCAA- Centro de Ciências Agrárias e Ambientais

FAO- Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

H₂S- Sulfeto de hidrogênio

Meq/L- Miliequivalente contido por litro de solução

Microlab- Laboratório de microbiologia dos alimentos

mL- Mililitro

UEPB- Universidade Estadual da Paraíba

YPG- Yeast peptone glucose

μL- Microlitros

RESUMO

SÁTIRO, LARISSA DE SOUSA. M.Sc. Universidade Estadual da Paraíba/ Embrapa Algodão, março de 2021. **Seleção de leveduras presentes na microfauna do abacaxi cultivado na paraíba para fermentação.** Campina Grande, PB, 2020. P 58. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias). Orientador: Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder.

Resumo: O estado da Paraíba é destaque nacional na produção e qualidade do fruto de abacaxi. No entanto as perdas de produção ocorridas em todas as etapas até a comercialização são elevadas. A fermentação alcoólica surge como uma forma de aproveitamento deste fruto, no entanto, quando conduzida de forma espontânea, a fermentação pode acarretar prejuízos para o produto, uma vez que as diferentes leveduras produzem vários compostos secundários. Portanto, com o intuito de maximizar o aproveitamento da produção excedente de abacaxi no estado da Paraíba e estimular o desenvolvimento de novos produtos com o uso da biotecnologia no presente trabalho objetivou-se isolar, caracterizar e selecionar leveduras provenientes da microfauna do fruto do abacaxi produzidos no estado da Paraíba que possuam características apropriadas para atender às condições empregadas no processo artesanal de produção de um vinho de abacaxi. Todo o estudo foi realizado no Complexo Agroindustrial localizado no *Campus* II da Universidade Estadual da Paraíba, no município de Lagoa Seca, Paraíba. Os frutos de abacaxi obtidos na CEASA em campina grande foram sanitizados e processados e o extrato do fruto foi reservado por 24 horas. O extrato de abacaxi foi então diluído e inoculado em placas de Petri, as quais foram incubadas por 48 horas em estufa microbiológica. As colônias que se desenvolveram isoladas foram coletadas e transferidas para tubos de ensaios com meio de cultura inclinado para serem submetidas aos testes de seleção. Os isolados passaram pelos testes de fermentação de glicose, de tolerância a etanol, de produção de sulfeto de hidrogênio, de resistência a alta temperatura e elevada concentração de glicose (50%). No estudo foram isoladas 120 colônias, e após realização de todos os testes de exclusão apenas uma das cepas apresentou todas as propriedades desejadas para o processo fermentativo. A cepa LA29 foi capaz de fermentar glicose bem como se mostrou tolerante às altas concentrações desta, bem como de etanol com bom desenvolvimento em meio a 18% de teor alcoólico, não apresentou produção de sulfeto de hidrogênio e se desenvolveu bem em altas temperaturas, a mesma quando exposta a condições do processo fermentativo mostrou-se eficiente e eficaz na produção de vinho de abacaxi.

Palavras-chave: *Ananas comosus* (L) merril. Fermentação alcoólica. Fermentado de frutas.

ABSTRACT

SATIRO, LARISSA DE SOUSA. M.Sc. State University of Paraíba / Embrapa Cotton, march 2021. Selection of yeasts present in the microfauna of pineapple grown in paraiba for fermentation. Campina Grande, PB, 2020. P 58. Dissertation (Graduate Program in Agricultural Sciences). Advisor: Prof. Dr. Diogo Gonçalves Neder.

Abstract: The pineapple is a fruit very appreciated in the world market not only for having pleasant sensory characteristics, but also for the nutritional and functional properties that it has. The state of Paraíba is a national highlight in the production and quality of the fruit. However, the production losses that occurred at all stages until commercialization are high. Alcoholic fermentation appears as a way of using this fruit, however, when conducted spontaneously, fermentation can cause damage to the product, since the different yeasts produce several secondary compounds. Therefore, in order to maximize the use of surplus pineapple production in the state of Paraíba and to stimulate the development of new products with the use of biotechnology, the present work aimed to isolate, characterize and select yeasts from the pineapple fruit microfauna produced in the state of Paraíba that have appropriate characteristics to meet the conditions employed in the artisanal process of producing a pineapple wine. The entire study was carried out at the Agroindustrial Complex located on Campus II of the State University of Paraíba, in the municipality of Lagoa Seca, Paraíba. The pineapple fruits obtained at CEASA in Campina Grande were sanitized and processed and the fruit extract was reserved for 24 hours. The pineapple extract was then diluted and inoculated in Petri dishes, which were incubated for 48 hours in a microbiological oven. The colonies that developed in isolation were collected and transferred to test tubes with an inclined culture medium to be subjected to selection tests. The isolates underwent glucose fermentation tests, ethanol tolerance, hydrogen sulfide production, high temperature resistance and high glucose concentration (50%). In the study, 120 colonies were isolated, and after all exclusion tests were carried out, only one of the strains had all the desired properties for the fermentation process. The LA29 strain was able to ferment glucose as well as being tolerant to high concentrations of it, as well as ethanol with good development in the middle of 18% alcohol content, did not show hydrogen sulfide production and developed well at high temperatures, even when exposed to conditions of the fermentation process, it proved to be efficient and effective in the production of pineapple wine.

Key words: *Ananas comosus* (L) merril. Alcoholic fermentation. Fruit fermentation

1 INTRODUÇÃO

O abacaxi é um fruto muito apreciado e cultivado em todas as regiões do mundo, constituindo-se num dos principais produtos da fruticultura nacional. O estado da Paraíba ganha destaque devido a grande qualidade do abacaxi produzido, no entanto as perdas ocorrentes nessa cultura são elevadas, e o aproveitamento industrial do abacaxi ainda é pequeno quando comparado ao consumo da fruta *in natura* (SILVA et al., 2010).

Embora haja investimentos em tecnologias pós colheitas, as perdas no setor de fruticultura representam cerca de 30 a 40% e são oriundas, em sua maioria das condições inadequadas de manuseio, armazenagem, doenças e injúrias mecânicas (DAMATTO JUNIOR et al., 2010). Visando o aproveitamento desta parcela excedente, a qual fica inviável a sua comercialização, uma alternativa é o processamento dos frutos, uma vez que reduz desperdícios, aumenta a vida de prateleira e agrega valor ao produto (FONTAN et al., 2011).

A elaboração de bebidas fermentadas surge como alternativa de aproveitamento destes frutos. Além disso, o mercado de bebidas fermentadas é bastante atrativo e os vinhos apresentam elevados índices de aceitabilidade (DIAS et al., 2016). Tradicionalmente, os vinhos são preparados pela fermentação de mostos de uvas, que produzem etanol e outros produtos metabólicos. No entanto, a literatura cita a produção de fermentados a partir de outras frutas, como o abacaxi (ARAÚJO et al., 2009; SILVA et al., 2010; PARENTE et al., 2014).

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico o qual consiste na conversão de açúcares em álcool. O Processo é realizado por microrganismos, principalmente leveduras e bactérias, em condições anaeróbicas, as quais utilizam os açúcares presentes no mosto para seu crescimento e multiplicação (MADIGAN et al, 2016). Contudo, a fermentação alcoólica quando conduzida de forma espontânea pode envolver um grande número de microrganismos, e, alguns destes podem produzir compostos indesejáveis para o produto.

A qualidade do produto da fermentação está diretamente relacionada as leveduras que atuam no processo. O uso de cepas de leveduras que estejam adaptadas ao ambiente onde a fermentação é realizada vêm a ser benéfico para o processo, e pode atribuir características únicas e inerentes ao produto (CALLEJON et al., 2010).

Para se obter um fermentado de qualidade algumas características fenotípicas e bioquímicas da levedura devem ser observadas, como a eficiência e eficácia fermentativa, e a tolerância aos compostos envolvidos no processo (OLIVEIRA, 2012). Estes fatores são essenciais para se avaliar a viabilidade da levedura em produzir um produto de qualidade, e que obedeça aos limites estabelecidos pela legislação vigente.

Fundamentado em tais informações, o uso da fermentação do fruto do abacaxi surge como uma forma de aproveitamento integral, uma vez que, todas as partes do abacaxi podem ser fermentadas, devido as quantidades apreciáveis de açúcares que o fruto apresenta, tornando-o mais favorável para a aplicação do processo de fermentação.

1.1 Objetivo geral

Isolar, caracterizar e selecionar uma linhagem de levedura fermentativa proveniente da microfauna do fruto do abacaxi produzido no estado da Paraíba, que possuam características apropriadas para atender às condições empregadas no processo artesanal de produção de um fermentado de abacaxi.

1.2 Objetivos específicos

- Isolar leveduras presentes na microfauna do abacaxi produzido na Paraíba;
- Avaliar o perfil dos isolados através de testes de exclusão por estresse;
- Testar a eficiência fermentativa da linhagem selecionada em escala laboratorial, com a produção de um fermentado de abacaxi;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Abacaxi

Nativo da América do sul, o abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) merril) é uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, pertencente à família Bromeliaceae. A planta é amplamente distribuída nas regiões neotropicais, onde está concentrada sua maior produção. Destaca-se economicamente por ser o mais importante representante do gênero *Ananas*, isso porque é o único representante da família bromeliácea a ser cultivado como fonte de alimento (MANETTI et al., 2009; LOBO e PAULL, 2017).

O seu fruto, o abacaxi (Figura 1), apresenta formato cilíndrico, ligeiramente cônico, e se desenvolve a partir de uma infrutescência com cerca de 50 a 200 pequenas frutas e uma coroa composta de até 150 folhas. As principais cultivares de abacaxi exploradas em todo mundo são: Smooth Cayenne, Spanish, Queen, Red Spanish, Pérola e Perolera, sendo as cultivares Smooth Cayenne e Pérola mais comercializadas no mercado brasileiro (GONÇALVES, 2010).

Figura 1 - Cultivar de abacaxi pérola.



Fonte: www.uepb.edu.br/ (2020).

O abacaxi tornou-se muito popular principalmente pelo seu sabor e aroma marcantes. O fruto é rico em água e açúcares, sendo a sacarose o principal açúcar acumulado. Também estão presentes em sua composição, alguns ácidos, principalmente o cítrico e o málico, carboidratos, alguns sais minerais e um teor elevado de vitaminas, principalmente a vitamina C (LOBO e PAULL, 2017; OLIVEIRA et al.; 2012; THE et al., 2010). O fruto também ganhou espaço na indústria farmacêutica e alimentícia por apresentar a bromelina, uma enzima a qual apresenta grande valor comercial (MANETTI et al., 2009).

No cenário mundial, o abacaxi é o terceiro fruto tropical mais importante, ficando atrás somente da banana e dos citros, seu consumo é apreciado no mercado mundial não somente por possuir características sensoriais agradáveis, mas também pelas propriedades nutricionais, funcionais e antioxidantes que este fruto possui (HOSSAIN, 2016). Quando se trata de produção, no ano de 2017, o Brasil foi considerado o terceiro maior produtor de abacaxi do mundo, com a produção estimada em 2.253.897 milhões de toneladas do fruto (Tabela 1), ficando atrás somente da Costa Rica e das Filipinas (FAO, 2017).

Tabela 1 – Ranking da produção mundial de abacaxi no ano de 2017, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO).

Ranking mundial de produção de abacaxi	
Países	Produção (t)
Costa Rica	3056445
Filipinas	2671711
Brasil	2253897
Tailândia	2123177
Índia	1861000
Indonésia	1795986
Nigéria	1642376
China	1576405
Colômbia	1091042
México	945210

Fonte: FAO (2017).

O estado brasileiro com a maior produção é o Pará com uma produção estimada em 426.780 toneladas de frutos colhidos em uma área de 18.779 hectares (Tabela 2). Na região Nordeste, se destaca o estado da Paraíba, com uma produção de 334.880 toneladas do fruto em uma área de 10.912 hectares, estando o estado em segundo lugar no ranking nacional (IBGE, 2019). O preço do fruto nessa região também influencia na comercialização dos estados vizinhos, como Alagoas, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, já que, a produção é dispersa por vários municípios (CONAB, 2020).

Tabela 2. Produção de abacaxi no Brasil no ano de 2018, segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Estados	Produção (Frutos x 10000)
Pará	426780
Paraíba	334880
Minas Gerais	192189
Rio de Janeiro	142258
São Paulo	95156

Fonte: IBGE (2019).

Na Paraíba o fruto do abacaxi é um dos principais produtos do agronegócio (Figura 2) com elevada importância econômica para o estado (MARTINS et al., 2012; IBGE, 2019). Além da produtividade mais elevada, o estado da Paraíba destaca-se também pela qualidade do fruto produzido, reconhecida nacionalmente, principalmente pelo bom nível tecnológico empregado no seu cultivo e pelas condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento adequado deste fruto (MARTINS et al., 2012).

No entanto, o fato do abacaxi ser um fruto não climatérico, ou seja, o fruto não amadurece após a colheita, torna a cadeia produtiva deste fruto um verdadeiro desafio, uma vez que a colheita dos frutos totalmente maduros reduz sua vida útil, dificultando o seu manuseio e transporte, devido à baixa resistência física. Isso, ocasiona perdas quantitativas e qualitativas (LOBO e PAULL, 2017).

Figura 2. Produção do abacaxi na Paraíba.



Fonte: IBGE (2020).

Estima-se que, no Brasil, o desperdício de alimentos oscile entre 40% e 80%, sendo a maior parte no transporte e manuseio dos produtos, para o abacaxi as perdas giram em torno de 10% a 15% (OLIVEIRA et al., 2012). Diante do enorme desperdício de alimentos surge a necessidade do aproveitamento integral destes frutos. Para evitar perdas de produção e prolongar a disponibilidade do fruto por mais tempo, uma alternativa seria o emprego de tecnologias na elaboração de novos produtos, como alternativa para a diminuição de perdas, diversificação de produtos e consequente agregação de valor (RODA et al., 2017).

2.2 Leveduras

Leveduras são microrganismos eucarióticos, pertencentes ao reino fungi. São aeróbias facultativas, ou seja, podem crescer na presença ou ausência de oxigênio. São amplamente distribuídas nos mais diversos ambientes e possuem fácil identificação. Seu formato celular é arredondado, sua reprodução geralmente ocorre por brotamento sendo, e em poucos gêneros, por fissão binária (MADIGAN et al., 2016).

As leveduras são os microrganismos mais importantes para a obtenção de álcool pela via fermentativa. Outros microrganismos, como a bactéria *Zymomonas mobilis*, também são capazes de produzir álcool, contudo, as leveduras são economicamente mais viáveis para a fermentação. No entanto, somente poucas espécies de leveduras possuem capacidade fermentativa (OLIVEIRA et al., 2001)

As leveduras fermentativas pertencem a família Saccharomycetaceae, as quais constituem o grupo mais importante de microrganismos explorados comercialmente, e são amplamente utilizadas em processos biotecnológicos, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* a mais amplamente utilizada na indústria de fermentação, isso devido à sua capacidade de fermentar vários açúcares e desenvolver mecanismos adequados para lidar com as condições de estresse encontrados nos processos fermentativos (BAI et al., 2008).

Durante o processo de fermentação pode haver um grande número de espécies de leveduras envolvidas o que pode ser prejudicial para a qualidade do produto, pois, os compostos produzidos por leveduras não selecionadas podem trazer características sensoriais desagradáveis ao consumo, podendo ocasionar variações na composição do produto ao longo da produção e não permitir uma padronização do produto ao longo das safras (OLIVEIRA, 2001)

É recomendável a utilização de linhagens selecionadas e aclimatadas a região onde ocorre o processo fermentativo, pois, acredita-se que o uso de leveduras autóctones por estarem mais adaptadas ao substrato e ao ambiente de vinificação, garantem a manutenção das características típicas dos vinhos de uma determinada região melhores adaptadas a região (OLIVEIRA, 2001; LOPES et al., 2007; CALLEJON et al., 2010).

Algumas das características desejáveis e que devem ser consideradas no momento da seleção da levedura são: a habilidade de fermentar rapidamente um amplo espectro de carboidratos, a capacidade de produzir e tolerar altas concentrações de etanol, tolerância a altas concentrações de glicose, produção de poucos subprodutos, de produzir ou não certos componentes do aroma das bebida, tolerância a variações na temperatura e a baixos valores de pH. Bem como, apresentar estabilidade genética, de forma que as características de interesse sejam mantidas nas futuras gerações (OLIVEIRA, 2012; BINOD et al., 2013).

Um dos parâmetros essenciais de seleção de leveduras é a ausência da produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S). Este composto está relacionado a formação de odores desagradáveis. A produção deste gás ocorre por via enzimática e está relacionada com redução de sulfato exógeno (UGLIANO; KOLOUCHOVA; HENSCHKE, 2009). A remoção do H_2S do vinho é complexa e problemática, por isso, é fundamental que, na elaboração de vinho sejam

empregadas linhagens que não o produzam. O uso de tais leveduras, apresentando elevada capacidade fermentativa, tem se mostrado uma solução eficaz (SILVA e SILVA, 1987).

A levedura inoculada é geralmente responsável pela fermentação e constitui a maioria da população de levedura ao final do processo. Desta forma, o processo de inoculação tem algumas vantagens tais como, a redução significativa da influência de outras leveduras encontradas naturalmente, rápida e completa fermentação do mosto e ainda permite um alto grau de reprodutibilidade de produção do vinho (ZUZUARREGUI e OLMO, 2004).

2.3 Fermentação alcoólica

A fermentação é um processo anaeróbico catalisado por enzimas, que convertem os açúcares simples em etanol e gás carbônico como principais produtos metabólitos. A principal via metabólica envolvida na fermentação é a glicólise, este processo envolve 12 reações em sequência ordenada, em que cada uma delas é catalisada por uma enzima específica. Tal complexo enzimático está situado no citoplasma celular, local onde ocorre a fermentação alcoólica (OLIVEIRA et al., 2001; MADIGAN et al., 2008).

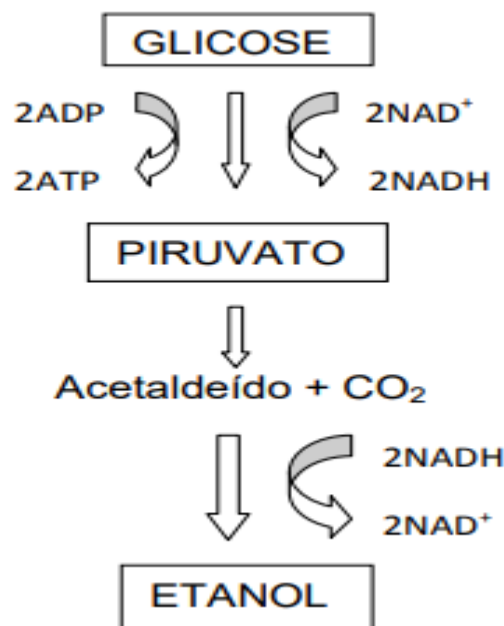
Na glicólise (Figura 3), uma molécula de glicose é oxidada produzindo duas moléculas de piruvato, duas moléculas de ATP e dois NADH^+ os quais poderão seguir na via respiratória ou na via fermentativa. Sob condições anaeróbicas, o piruvato segue na via fermentativa onde ocorre em duas etapas: na primeira etapa o piruvato é descarboxilado em acetaldeído pela ação da enzima piruvato descarboxilase, na segunda etapa o acetaldeído é reduzido a etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase (MADIGAN et al, 2016).

A fermentação alcoólica ocorre em três fases distintas. A primeira delas, a pré-fermentação, se inicia quando as leveduras são adicionadas ao mosto devidamente preparado, esta fase se caracteriza por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Após um período de cinco a seis horas, inicia-se a fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto, devido à conversão dos açúcares em álcool, e a elevação da acidez.

A fase seguinte, chamada de pós-fermentação, é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico e ausência de espumas. Essa fase deve durar o mínimo possível para evitar a infecção do vinho (ANTONINI, 2004). Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a maneira através da qual o substrato é adicionado e o produto retirado, as fermentações alcoólicas podem ser

conduzidas por processos descontínuo, descontínuo-alimentado ou contínuo, bem como, por variações desses processos (FERREIRA, 2005).

Figura 3. Esquema simplificado da glicólise e fermentação, evidenciando a conversão de glicose em etanol.



Fonte: Autor, 2020.

Na fermentação descontínua ou em batelada, a matéria-prima é adicionada ao reator no início do processo, juntamente com os microrganismos, nutrientes e outros ingredientes. No decorrer do processo nada é adicionado, exceto oxigênio na forma de ar. Igualmente nada é retirado, exceto gases que não foram gastos, assim o volume do reator permanece constante. Terminada a fermentação, descarrega-se a dorna, e o meio fermentado segue para os tratamentos finais. Já na fermentação descontínua-alimentada, também chamada de batelada alimentada, o substrato é adicionado de forma contínua e crescente ao reator. (ZABED et al., 2014; CNPEM, 2017).

Na fermentação contínua o reator é continuamente alimentado por uma ou mais correntes de entrada, contendo os nutrientes necessários, enquanto as células, produtos e resíduos são removidos continuamente (LIM e SHIN, 2013). A seleção do modo mais adequado de fermentação depende, principalmente, da cinética dos microrganismos utilizados e da natureza da matéria-prima (ZABED et al., 2014).

2.4 Fatores que afetam a fermentação

O sucesso de um processo fermentativo depende de vários fatores, sendo eles físicos, químicos e microbiológicos. Esses fatores são referidos como 'estresse' da levedura. Entre os principais fatores que afetam a produção de etanol destacam-se: temperatura, tempo de alimentação do substrato, concentração de inoculo (Pé-de-cuba), pH, contaminação bacteriana, altas concentrações de açúcar, altos níveis de etanol e disponibilidade de nutrientes e inibidores (AMORIM, LIMA e BASSO, 2001; LOPES et al., 2016).

Para a seleção de leveduras é interessante estabelecer propriedades enológicas. Os critérios podem ser divididos em: favoráveis, como tolerância ao etanol, bom rendimento na transformação dos açúcares em etanol e capacidade de crescer em altas concentrações de açúcares ou desfavoráveis, como a produção de H₂S, produção de espuma e acidez volátil (ESTEVE-ZARZOZO et. al., 2000).

2.4.1 Etanol

A tolerância ao etanol é requisito primordial na seleção de leveduras, visto que a tolerância a elevadas concentrações de etanol interfere diretamente no rendimento do processo fermentativo (CARRASOCO et al., 2001). Em altas concentrações, o etanol causa alterações na membrana plasmática, mais especificamente na camada lipídica, reduzindo à atividade metabólica em resposta a diminuição do transporte de glicose, causando estresse hídrico (OLIVA-NETO, 2011; PINA, et al., 2014).

Dessa forma o etanol é considerado o maior inibidor da viabilidade celular da levedura, retardando o crescimento e reduzindo a capacidade fermentativa (OLIVA-NETO, 2011). Entretanto, o álcool parece não ter um efeito único, além de agir na viabilidade da membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto, também exerce efeito sobre algumas enzimas (STECKELBERG, 2001).

A tolerância ao etanol tem sido correlacionada com a capacidade das células de modificar sua composição de lipídios para responder à ação perturbadora de etanol. Isso faz parte de um sistema regulatório, que assegura o ajuste das propriedades físico-químicas da matriz lipídica da membrana em uma faixa fisiologicamente ótima. No entanto esses mecanismos ainda não são completamente entendidos (PINA, et al., 2004).

2.4.2 Temperatura

O controle da temperatura é essencial durante o processo fermentativo, uma vez que, ela influencia diretamente no metabolismo celular da levedura e na produção de compostos voláteis. (LIMA, 2009). Leveduras apresentam maiores rendimentos em temperaturas em torno de 25°C e 30°C. Valores acima dos citados podem reduzir o potencial fermentativo da levedura, pois afetam a viabilidade celular, interferindo na capacidade de conversão do substrato em etanol. Temperaturas inferiores a 25° C também provocam alterações no processo fermentativo, pois reduzem a atividade metabólica da levedura. (SILVA-FILHO et al., 2005; CARDOSO, 2006). O intervalo de temperatura entre 28-32 °C é ideal para a produção de etanol (MORAES, 2001).

2.4.3 Altas concentrações de glicose

Altas concentrações de glicose refletem negativamente na viabilidade celular da levedura. O aumento da osmolaridade externa, causado por elevadas taxas de glicose, causam inibição do crescimento e perda da viabilidade das células devido as perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática, o que ocasiona perdas em volumes das células, que se contraem por causa de diferentes pressões osmóticas entre o interior e o exterior das células. (SOUZA, 2009)

2.4.4 pH

O pH tem influência direta nos processos fermentativos, devido à sua importância no controle de contaminação bacteriana, ao seu efeito sobre o crescimento de leveduras, às taxas de fermentação e à formação de subprodutos (CALDAS; BOREM; SANTOS; 2012). A falta de correção do pH favorece a formação de metabólicos secundários pelas leveduras, induzindo-as a ativarem outras rotas metabólicas. (SOUZA, 2011).

Fermentações conduzidas em meios ácidos resultam em maiores rendimentos de etanol, pelo fato de restringir o crescimento do fermento, com a consequente redução da produção de glicerol, ao mesmo tempo que reduz a contaminação microbiana (LIMA et al., 2001). O pH ideal para a produção de etanol fica em torno de 4,5-5. Valores de pH abaixo de 4,0 causam desvios no metabolismo da levedura induzindo a produção de álcoois superiores, enquanto pH acima de 5,0 induz a produção de produz ácido acético e furfural (SOUZA, 2011).

2.5 Fermentação de frutas

A elaboração de bebida fermentadas é um dos mais antigos processos realizados pelo homem. Há relatos do uso desta técnica há milhares de anos. Essas bebidas surgiram com a própria evolução da humanidade e além do aspecto financeiro, há também toda uma cultura e tradição atribuída a este processo (VENTURINI FILHO, 2016).

A produção de vinhos a partir de frutos de uva é bastante tradicional, no entanto com os avanços tecnológicos na viticultura, tem se buscado o desenvolvimento de novos processos que visem o aproveitamento do fruto no intuito de evitar o desperdício, quando sua comercialização não é mais viável, assim como, agregar valor às bebidas regionais (DIAS et al., 2016; ASQUIERI, 2009).

De acordo com o decreto nº 6.871 de 2009 o fermentado de frutas é aquele obtido através da fermentação alcoólica do mosto da fruta saudável, fresca e madura de uma única espécie, obtida do suco integral ou concentrado, ou da polpa. Neste é permitida a adição de açúcares, água e de outros aditivos definidos para cada tipo de fruta. As bebidas produzidas por fermentação alcoólica que não seja a uva, deve-se indicar o nome da fruta, como por exemplo, vinho de laranja, vinho de abacaxi (BRASIL, 2009).

A portaria nº 64 de 23 de abril de 2008 determina os padrões de qualidade para fermentados de frutas, esta por sua vez, determina que a composição química do fermentado de frutas deverá obedecer os seguintes limites: o teores de acidez total devem oscilar entre 50 e 130 meq/L, e o teor alcoólico deve variar entre 4% e 14% em volume, à uma temperatura de 20 °C (BRASIL, 2008).

Quanto aos teores de pH, a Legislação Brasileira não estabelece limites, entretanto, sabe-se que o pH é particularmente importante, principalmente por seu efeito sobre os microrganismos, devendo está entre 4,5 e 5. (SOUZA, 2011; TORRES-NETO et al, 2006). Estes e outros parâmetros são essenciais para a determinação da qualidade do produto.

Na literatura há relatos do uso de várias frutas para a produção de vinho de frutas, como a laranja (ALCÂNTARA e MENEZES, 2017), umbu (SILVA; DANTAS, 2017), figo-da-índia (LOPES e SILVA, 2006), melancia (FONTAN et al., 2011), abacaxi (PINO e QUERIS, 2010; RODA et al., 2017; DELACASSA et al., 2017) dentre outras. Estas bebidas, geralmente são produzidas de forma artesanal e em pequena escala, contudo para produção destas bebidas deve-se dispor de condições adequadas respeitando à legislação vigente (VENTURINI-FILHO, 2016).

3 METODOLOGIA

3.1 Localização da pesquisa

A pesquisa foi realizada no laboratório de microbiologia dos alimentos (Microlab), situado no Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CCAA) da Universidade Estadual da Paraíba-UEPB, situados no campus II, na cidade de Lagoa Seca.

3.1.1 Obtenção do fruto e fermentação espontânea

Os abacaxis usados no experimento foram obtidos no mercado local da cidade de Campina Grande-PB. Após a obtenção dos frutos, os mesmos foram transportados ao Microlab do CCAA/UEPB, onde foram higienizados em água corrente e sabão para a remoção de sujidades. Posteriormente com auxílio de uma faca (previamente esterilizada), o fruto foi cortado em partes a fim de facilitar o processamento, e com um auxílio de um processador de alimentos foi realizada a extração do suco. Logo após o extrato de abacaxi foi armazenado durante 48 horas em temperatura ambiente para que ocorresse a fermentação espontânea.

3.1.2 Meios de cultivo

Meio Agar YPG (isolamento, manutenção e tolerância a etanol)

Composição:

- Ágar1%
- Peptona.....0,3%
- Extrato de levedura0,3%
- Glicose2%
- Água destilada

O meio Ágar YPG foi utilizado na maioria dos procedimentos variando apenas a concentração de açúcar na fase de isolamento das leveduras (glicose a 30%) e a adição de álcool nas proporções desejadas no teste de tolerância a etanol.

Meio YPG líquido (teste de fermentação)

Composição:

- Peptona0,75%
- Extrato de levedura0,75%
- Glicose2%
- Água destilada

Meio Ágar LA (teste de produção de sulfeto)

Composição:

- Glicose4%
- Extrato de levedura0,5%
- Peptona0,3%
- Sulfato de amônio0,02%
- Acetato de chumbo neutro0,1%
- Ágar2%
- Água destilada

Em todos os meios trabalhados foram realizados ajustes do pH visando obter sempre um nível próximo do valor “4”, visto que o desenvolvimento de leveduras se dá mais satisfatoriamente em meio ácido. Para isso fez-se uso de ácido cítrico diluído a uma concentração de 10% em água destilada.

Todos os meios de cultivo foram esterilizados após formulação em autoclave vertical a 121 °C por 15 minutos. As vidrarias utilizadas na condução do experimento, béqueres, placas de Petri, tubos, pipetas e provetas também foram esterilizadas nas mesmas condições.

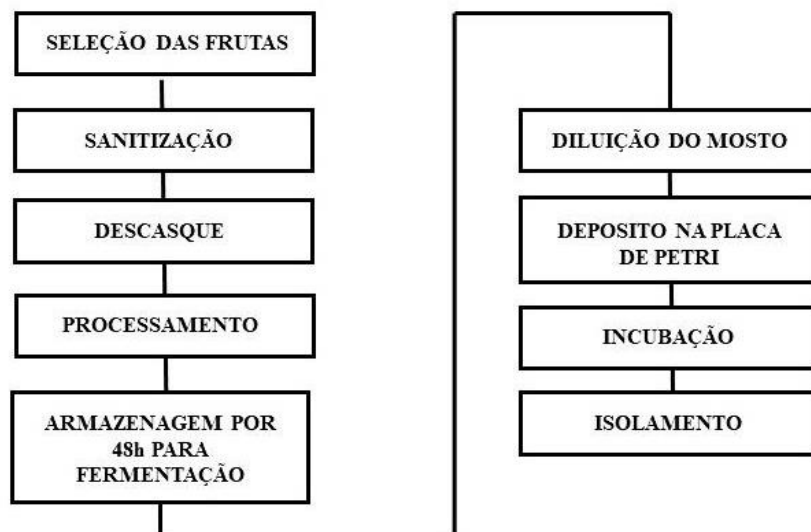
3.2 Isolamento

Para realização do isolamento foi utilizado o meio ágar YPG com a seguinte composição (0,75% de Extrato de Levedura, 0,75% de Peptona, 30% de glicose e 2% de Ágar), o meio foi autoclavado e posteriormente acidificado com solução de ácido cítrico para inibição do

desenvolvimento de micro-organismos concorrentes e vertido em placas de petri (KURTZMAN, 2011). De acordo com Oliveira et al. 2012, o baixo valor do pH em fermentados, é um fator importante para inibir a contaminação bacteriana, além de favorecer o desenvolvimento de leveduras que apresentam crescimento ótimo em ph ácido.

Em seguida foi realizada a diluição de 1 ml do mosto em 300ml de água autoclavada e desta solução uma alíquota de 100 µL foi retirada com o auxílio de um pipetador. A amostra foi depositada e espalhada sob as placas de petri com auxílio de uma alça de drigalski. As placas foram incubadas a 28° C. Ao primeiro sinal de aparecimento de colônias estas foram semeadas em tubos de ensaio contendo meio ágar YPG 30% acidificado. Os tubos foram mantidos em duplicata, lacrados e devidamente identificados a uma temperatura de 28° C (figura 4).

Figura 4- Fluxograma de fermentação espontânea e isolamento em abacaxi.



Fonte: Autor, 2020.

3.3 Teste de exclusão por estresse

As cepas isoladas foram submetidas a testes de exclusão por estresse. A exposição ao estresse tem por finalidade selecionar as leveduras tolerantes as condições impostas pelo processo fermentativo.

3.3.1 Testes da capacidade fermentativa de glicose

O teste da capacidade fermentativa foi realizado em duplicata, seguindo a técnica de tubos múltiplos (MOREIRA et al, 2015; VIANA, 2017). Para verificar a capacidade fermentativa, uma alçada de cada cepa foi inoculada em um tubo de ensaio fechado com bucha contendo 7 mL de meio YPG líquido (0,75% peptona, 0,45% extrato de levedura e 2% glicose) e um tudo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 28 °C e lidos nos dias 1, 2, 3 e 4 após a inoculação. Foram consideradas leituras negativas quando não houve acúmulo de gás no tubo de Durham, representadas por + quando somente 1/3 do tudo de Durham estivesse preenchido por gás, por ++ quando o gás estivesse presente em 2/3 do tubo e por +++ quando o tubo de Durham estivesse completamente cheio de gás (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação das leituras de capacidade fermentativa de glicose.

OBSERVAÇÕES	REPRESENTAÇÕES
Sem acúmulo de gás no tubo	-
Acúmulo de gás em 1/3 do tubo	+
Acúmulo de gás em 2/3 do tubo	++
Acúmulo de gás em todo tubo	+++

Fonte: Autor, 2020

3.3.2 Teste de tolerância a etanol

O teste de tolerância ao etanol foi realizado em duplicata, e para esse teste as cepas foram previamente cultivadas em meio YPG líquido (0,45% de Extrato de Levedura, 0,75% de Peptona, e 2% de glicose) por 24 horas à 28° C. Uma alíquota de 10 µL do inóculo foi depositada em micropoços feitos em placas de petri contendo meio de cultura para manutenção de leveduras- YPG (2%) suplementado com etanol nas proporções de 8%, 14% e 18%. Foi considerado como controle placas com o mesmo meio adicionado de água autoclavada nas mesmas proporções de etanol e incubados a 28 °C por 7 dias. As colônias que apresentarem desenvolvimento igual ou superior ao controle, nas diferentes concentrações de etanol, foram consideradas tolerantes

3.3.3 Detecção de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Para detectar a produção de H₂S os isolados foram previamente cultivados em meio ágar líquido (0,45% de Extrato de Levedura, 0,75% de Peptona, e 2% de glicose) por 24 horas à 28° C. Após o cultivo uma alíquota de 10 µL foi depositada em micro poços feitos em placas de Petri contendo meio LA (4% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 0,3% de peptona, 0,02% de sulfato de amônio, 0,1% de acetato de chumbo neutro e 2% de Agar) e incubados a 28 °C durante 7 dias. As colônias que apresentaram uma coloração de preto a marrom foram consideradas produtoras de H₂S e as que apresentaram uma coloração de branco a bege serão consideradas não ou pouco produtoras, as cepas produtoras de sulfeto de hidrogênio (H₂S) foram excluídas do estudo, sendo selecionada apenas as que não produziram, ou produziram pouco H₂S. O teste foi realizado em duplicata.

3.3.4 Crescimento em diferentes temperaturas

O teste de crescimento em diferentes temperaturas foi realizado em duplicata. Para esse teste, as cepas foram previamente cultivadas em meio ágar YPG com a seguinte composição (0,75% de Extrato de Levedura, 0,75% de Peptona, 30% de glicose e 2% de Ágar), o meio foi autoclavado e posteriormente acidificado com solução de ácido cítrico e vertido em placas de petri (KURTZMAN, 2011). Após o crescimento das cepas nos tubos foi realizada uma raspagem no tubo com o auxílio de um swab.

Na sequência foram feitos riscos com o swab em placas de petri com meio ágar YPG na mesma composição dos tubos. As placas foram incubadas em estufas nas seguintes temperaturas (37° C, 40° C e 42 °C), durante 4 dias conforme recomendações de Kurtzman (2011). Como controle as placas foram incubadas a 28° C. Serão consideradas tolerantes as cepas que apresentarem crescimento igual ou próximo ao controle.

3.3.5 Teste de tolerância a altas concentrações de glicose

O teste de tolerância a altas concentrações de glicose foi realizado em duplicata. Para esse teste, as cepas foram previamente cultivadas em meio líquido MBF (0,45% de Extrato de Levedura, 0,75% de Peptona, e 2% de glicose) por 24 horas à 28° C. Após o cultivo será inoculado uma alíquota da colônia correspondente a 600 µL em placas de petri contendo meio

YPG suplementado com glicose na proporção de 50%. Foi considerado como controle o mesmo meio de cultura com 2% de glicose. Foram consideradas tolerantes as leveduras que apresentarem crescimento, próximo, igual ou superior ao controle.

3.3.6 Fermentação do suco de abacaxi

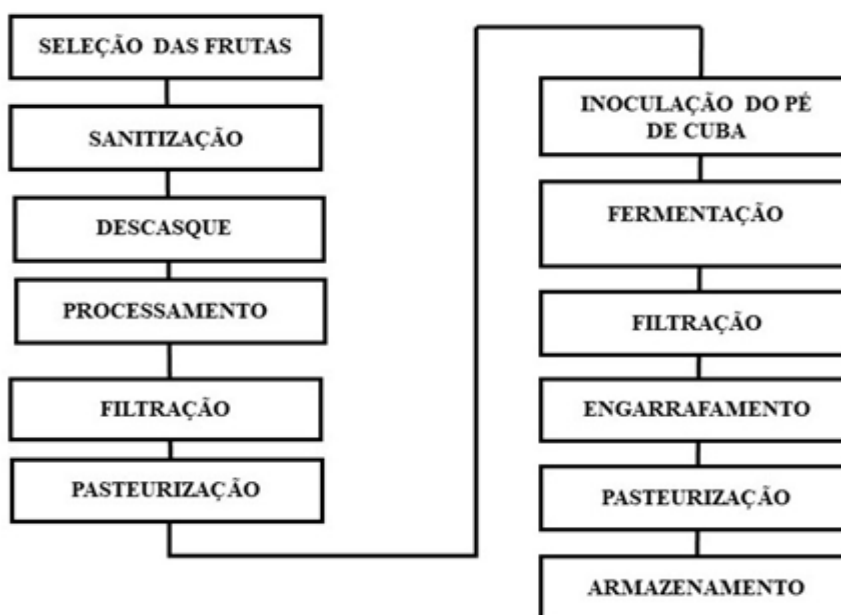
Após a seleção das cepas, foi realizado o cultivo e multiplicação das cepas em placas de petri contendo meio de cultura ágar YPG (2%) até o crescimento das colônias. Cada cepa foi inoculada em 4 placas a fim de se obter a quantidade suficiente para inoculação do pé-de-cuba.

A preparação do pé-de-cuba ocorreu em duas etapas conforme a metodologia descrita por Gonçalves, (2015) com algumas modificações. Na primeira etapa foi utilizado 100 ml do suco de abacaxi autoclavado, neste foi inoculado 4 alçadas de cada cepa. Após a inoculação, o mosto foi mantido em estufa a 30°C por 24 horas. Na segunda etapa foi adicionado assepticamente ao mosto 100ml do suco de abacaxi autoclavado, após isso foi mantido em estufa a 30°C por 24 horas. O processo de preparação do pé-de-cuba ocorreu em 48 h, foram produzidos 200 ml de pé-de-cuba para cada cepa.

Após a preparação do pé-de-cuba, foi realizada a inoculação das cepas no suco de abacaxi para a formação do pé-de-cuba. Para a produção do suco foram utilizados abacaxis provenientes do município de Sapé-PB. Os frutos foram encaminhados ao Microlab do CCAA/UEPB, onde foram higienizados em água corrente e sabão para a remoção de sujidades e posteriormente foi removida a casca e a polpa cortado em cubos a fim de facilitar o processamento, e com um auxílio de um processador de alimentos foi realizada a extração do suco.

Feita a extração do suco foi separado 1,8 L de suco de abacaxi para cada cepa testada. O suco de abacaxi foi previamente pasteurizado a 70° C por 15 minutos seguido de resfriamento até 30°C. Após o resfriamento foi inoculado 200ml do pé-de-cuba ao suco de abacaxi pasteurizado, totalizando 2L de produto (Suco + Pé-de-cuba). Após a inoculação iniciou-se o processo fermentativo em temperatura ambiente. Para o acompanhamento da fermentação foi realizado a leitura do °brix e pH a cada 24 horas, até a estabilização dos valores de açúcares (figura 5).

Figura 5. Fluxograma de processamento e produção de vinho de abacaxi.



Fonte: Autor (2020).

Após a estabilização dos teores de açúcar, o vinho foi filtrado e armazenados em recipientes de plástico e deixado em repouso para decantação dos resíduos por 7 dias. Após o período de decantação foi realizada a trafega, onde o vinho foi transferido para um recipiente de vidro fechado e foi novamente pasteurizado em banho-maria por 15 minutos a 70° C e posteriormente resfriado e armazenado a temperatura ambiente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização do isolamento das leveduras, buscou-se realizar todos os procedimentos de forma criteriosa visando alcançar as leveduras com melhor perfil. Primeiramente, foi realizada a fermentação espontânea do suco de abacaxi, onde o suco de um abacaxi foi deixado em temperatura ambiente por 48 horas. A inoculação e isolamento ocorreram em três tempos de fermentação. A primeira inoculação (Tempo 0) foi realizada imediatamente após o processamento do suco de abacaxi. Foram inoculadas 10 placas com o meio de isolamento e o suco não fermentado. Após o crescimento das colônias foram isoladas 40 cepas. As cepas isoladas neste tempo representam a microfauna de leveduras do abacaxi não fermentado.

Após 24 horas (Tempo 2) foi realizada a segunda inoculação. Novamente foram inoculadas 10 placas com o meio de isolamento sendo o suco fermentado. Após o crescimento das colônias foram isoladas 40 cepas. O processo de inoculação e isolamento foi repetido com 48 horas (Tempo 3). Ao fim do processo foram isoladas 120 cepas de leveduras (TABELA 4).

Tabela 4. Número de colônias isoladas em cada tempo de fermentação.

Tempo (h)	0	24	48	Total
Isolados	40	40	40	120

O número de isolados foi considerada razoável, outros trabalhos dessa mesma natureza, obtiveram números menores. Guimarães (2005) trabalhando com isolamento e seleção de cepas de *S. cerevisiae* para produção de vinho, isolou 61 leveduras nesta etapa do trabalho. Do mesmo modo Oliveira et al. (2015) isolando leveduras do abacaxi obteve 49 isolados para a seleção.

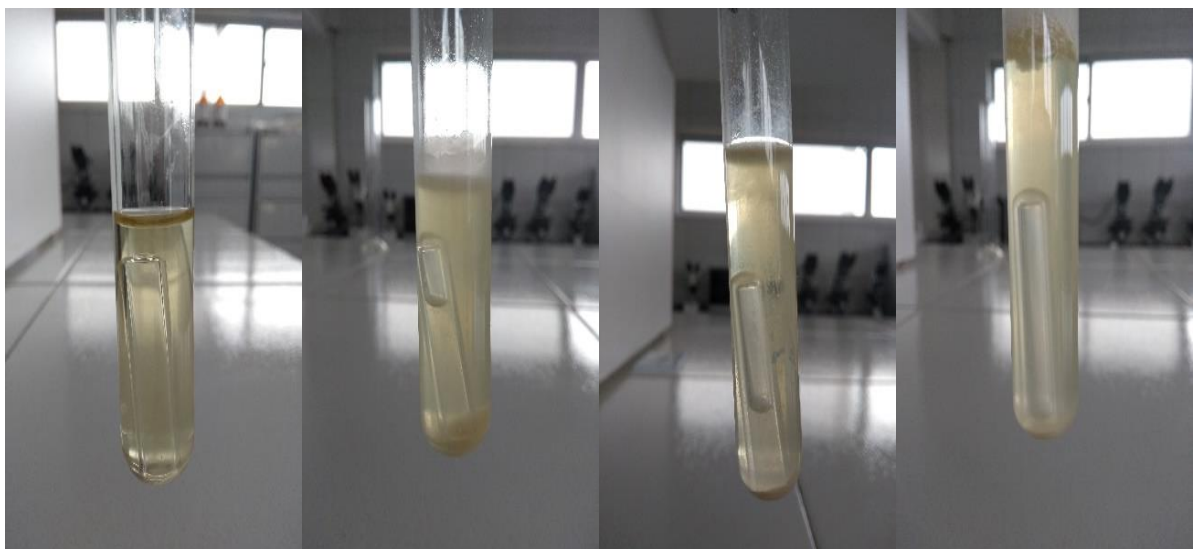
As cepas foram denominadas pelo prefixo “LA” com o “L” fazendo referência ao município de Lagoa Seca - PB, onde foi realizado o experimento e o “A” fazendo referência ao abacaxi. A numeração foi feita de acordo com a ordem de isolamento, sendo, portanto, a primeira cepa isolada denominada de LA01, a segunda LA02 e assim sucessivamente.

A atividade de isolamento visando a seleção de representantes locais segue a premissa de que o acesso a diversidade de leveduras de dada localidade contribui com a formação da identidade regional do produto em questão (BARBOSA et al., 2016).

Após o isolamento e crescimento das leveduras estas foram submetidas a testes de estresses, estes os quais simularam as condições impostas durante o processo fermentativo. O primeiro teste realizado foi o de fermentação de glicose. A fermentação de glicose é condição primordial para sobrevivência nos processos fermentativos, pois, sendo este a fonte de carbono mais encontrada nos materiais vegetais, é de primordial importância que a cepa consiga assimilá-lo.

Todos os 120 isolados foram submetidos ao teste de fermentação de glicose. Para isso foram inoculados tubos de ensaio com meio MBF com um tubo de Durham, onde foi depositado uma alíquota de cada cepa e incubados em estufa a 28 °C por 4 dias. As amostras foram lidas a cada 24h após a inoculação. Foram consideradas leituras negativas quando não houvesse acúmulo de gás no tubo de Durham, + quando somente 1/3 do tubo de Durham estivesse preenchido por gás, ++ quando o gás estivesse presente em 2/3 do tubo e +++ quando o tubo de Durham estivesse completamente cheio de gás (Figura 6).

Figura 6. Leitura do teste de fermentação de glicose. Da esquerda para a direita: resultado negativo, resultado +1, resultado +2 e resultado +3.



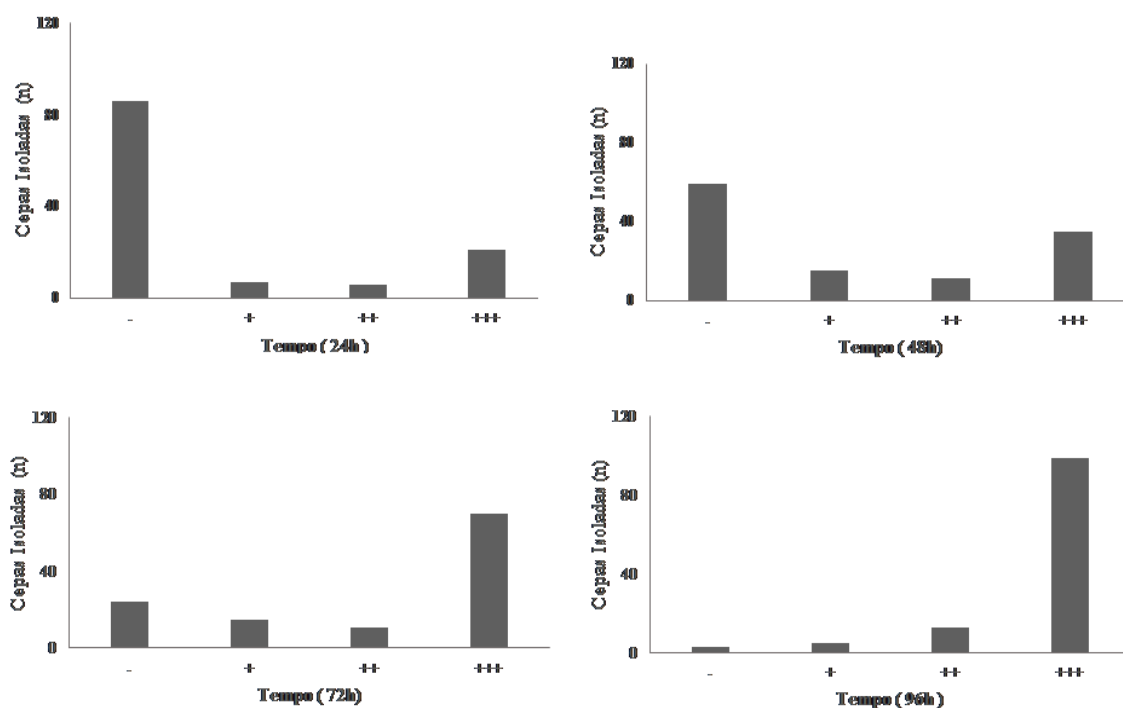
Fonte: Autor, 2019.

Para efeito de seleção, apenas as cepas que fermentaram +3 com até 48 horas foram selecionadas. Esse parâmetro de exclusão foi escolhido, pois a fermentação rápida é essencial para o bom desenvolvimento do processo fermentativo. Das 120 cepas testadas 99 apresentaram sinais de fermentação em algum momento e 21 não fermentaram.

Das 99 cepas que apresentaram fermentação 21 cepas fermentaram +3 nas primeiras 24 horas. 14 cepas fermentaram +3 com 48h, totalizando 35 cepas. 35 cepas fermentaram +3 com 72h, totalizando 70 cepas fermentativas e 29 cepas fermentaram +3 com 96h totalizando 99 cepas fermentativas. No entanto, somente as mais eficientes foram selecionadas. A Figura 7, mostra o comportamento das cepas durante o teste de estresse.

Nesta etapa foram selecionadas 35 cepas. Os resultados obtidos demonstram que as cepas selecionadas apresentaram bom desempenho fermentativo, com todas atingindo o máximo de volume do tubo já no segundo dia de efetivo processo. As demais cepas não apresentaram a capacidade de fermentar rapidamente, logo foram excluídas do teste.

Figura 7. Comportamento fermentativo das cepas isoladas do abacaxi submetidas ao teste de fermentação de glicose.



Fonte: Autor, 2020.

As 35 cepas que continuaram nos testes foram: LA01, LA02, LA05, LA06, LA07, LA08, LA09, LA11, LA12, LA13, LA14, LA16, LA17, LA18, LA19, LA20, LA22, LA28, LA29, LA30, LA33, LA34, LA35, LA36, LA37, LA38, LA40, LA41, LA42, LA43, LA44, LA45, LA47, LA50, LA54.

As leveduras consideradas positivas para a fermentação de glicose foram submetidas ao teste de detecção de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Para detectar produção de H₂S pelos isolados, estes foram cultivados em meio LA por 7 dias. No teste de produção de H₂S foi observado a coloração das cepas, as colônias que apresentaram uma coloração de preto a marrom foram consideradas produtoras e as que apresentarem uma coloração de branco a bege foram consideradas não ou pouco produtoras.

De acordo com Guimarães (2005) as colônias escuras são características de leveduras superprodutoras de sulfeto de hidrogênio e a produção desta substância atribui odor e sabor desagradáveis às bebidas (RIBEIRO e HORII, 2002). A produção deste gás ocorre por via enzimática e está relacionada com redução de sulfato exógeno (UGLIANO et al., 2009).

Das 35 cepas submetidas ao teste, 8 apresentaram coloração marrom ou preta, sendo estas excluídas do teste. Neto e Mendes-Ferreira (2005) em trabalho realizado com uva, observaram aumento significativo na produção de sulfeto em espécies não *Saccharomyces* quando comparadas com *Saccharomyces*, demonstrando a importância dessas espécies nos processos fermentativos. A tabela 4, distribui o resultado do teste de produção de sulfeto.

Tabela 5. Produção de sulfeto de hidrogênio pelas cepas identificadas no experimento.

Cepas	Produção de H ₂ S	Cepas	Produção de H ₂ S
LA01	-	LA29	-
LA02	-	LA30	-
LA05	-	LA33	+
LA06	-	LA34	-
LA07	-	LA35	-
LA08	+	LA36	-
LA09	-	LA37	-
LA11	+	LA38	+
LA12	+	LA40	-
LA13	+	LA41	-

LA14	+	LA42	-
LA16	-	LA43	-
LA17	-	LA44	-
LA18	-	LA45	-
LA19	-	LA47	-
LA20	-	LA50	-
LA22	-	LA54	-
LA28	+		

Fonte: Autor, 2020.

As 27 cepas que não apresentaram coloração escura foram submetidas ao teste de etanol. Vários parâmetros fisiológicos são essenciais para que as leveduras tolerem as condições impostas no processo fermentativo, contudo a tolerância a alta concentração de etanol é a principal característica que permite a sua sobrevivência neste ambiente específico (PINA et al, 2004). De acordo com Chi e Ameborg (2000), o estresse etanólico é uma das condições mais interessantes para ser analisada, uma vez que a tolerância ao etanol é um critério tradicional utilizado na seleção de leveduras, devido a presença de uma concentração elevada desta substância durante a vinificação.

De acordo com Izawa et al., 2010, o álcool possui ação tóxica atinge diretamente a organização da membrana citoplasmática, modificando a composição lipídica e permeabilidade da membrana para alguns íons, reduzindo a viabilidade celular. As 27 cepas foram testadas em concentrações crescentes de etanol (8%, 14% e 18%). Nenhuma das cepas testadas nenhuma apresentou crescimento significativo na proporção de 18%, com isso, foram consideradas tolerantes as cepas que apresentaram crescimento nas duas outras proporções de etanol. 18 cepas toleraram as duas concentrações de etanol (8% e 14). As cepas LA47 E LA54 cresceram apenas na concentração de 8%, não tolerando a concentração de 14%, e 7 cepas não toleraram nenhuma das duas concentrações. O resultado do teste pode ser observado na tabela 5.

Tabela 6. Tolerância das cepas ao etanol.

CEPAS	8%	14%	18%
LA01	+	+	-
LA02	+	+	-
LA05	+	+	-
LA06	-	-	-
LA07	+	+	-
LA09	+	+	-
LA16	+	+	-
LA17	+	+	-
LA18	+	+	-
LA19	+	+	-
LA20	+	+	-
LA22	-	-	-
LA29	+	+	-
LA30	+	+	-
LA34	+	+	-
LA35	+	+	-
LA36	+	+	-
LA37	-	-	-
LA40	-	-	-
LA41	-	-	-
LA42	+	+	-
LA43	-	-	-
LA44	-	-	-
LA45	+	+	-
LA47	+	-	-
LA50	+	+	-
LA54	+	-	-

Fonte: Autor, 2020.

De acordo com Pina et al, 2004, leveduras do gênero *Saccharomyces* são mais propensas a tolerarem altas concentrações de etanol, segundo os autores, leveduras não *Saccharomyces* raramente conseguem sobreviver a proporções maiores que 6%. Já para PATARO et. al. (2000), a maioria das espécies de leveduras isoladas em processos fermentativos artesanais, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, são fisiologicamente adaptadas às condições observadas nas dornas de fermentação com temperatura de 37°C, 50% de glicose e 8% etanol.

Bueno-Neto (1982) a partir de seu estudo afirma que o efeito inibidor do álcool, em relação ao crescimento celular, só ocorre a partir de uma concentração de 7,2% (v/v), o autor utilizou como inóculo o *Saccharomyces cerevisiae*. Já Basso et al. (2011) defende que essa concentração de etanol pode variar de 8 a 12% (v/v) para que o álcool já seja considerado um fator de estresse que age sobre a levedura.

Outro fator determinante para ótimos rendimentos fermentativos é a temperatura. BARNABÉ et al. (2005) descreve como ótima para o crescimento das leveduras a faixa de temperatura de 28°C à 35 °C. Nessa faixa enzimas invertases da levedura trabalham em condição adequada, atingindo estabilidade e atividade máxima (SHANKAR et al., 2014)

Neste estudo as cepas de leveduras foram submetidas a quatro temperaturas crescentes, sendo 30, 35, 40 e 42°. Das 18 cepas testadas, nenhuma apresentou crescimento quando testadas a 42°C. Apenas as cepas LA01, LA09, LA19 e LA29 apresentaram crescimento a temperatura de 40° C. Estas foram submetidas ao teste seguinte, sendo as demais descartadas do teste de seleção. O resultado de teste de resistência a altas temperaturas podem ser visto na tabela 6.

Tabela 7. Teste de resistência à altas temperaturas

CEPAS	30°	35°C	40°C	42°C
LA01	+	+	+	-
LA02	+	-	-	-
LA05	+	-	-	-
LA07	+	-	-	-
LA09	+	+	+	-
LA16	+	-	-	-
Cont.				
LA17	+	+	-	-

LA18	+	-	-	-
LA19	+	+	+	-
LA20	+	-	-	-
LA29	+	+	+	-
LA30	+	+	-	-
LA34	+	-	-	-
LA35	+	-	-	-
LA36	+	-	-	-
LA42	+	-	-	-
LA45	+	-	-	-
LA50	+	-	-	-

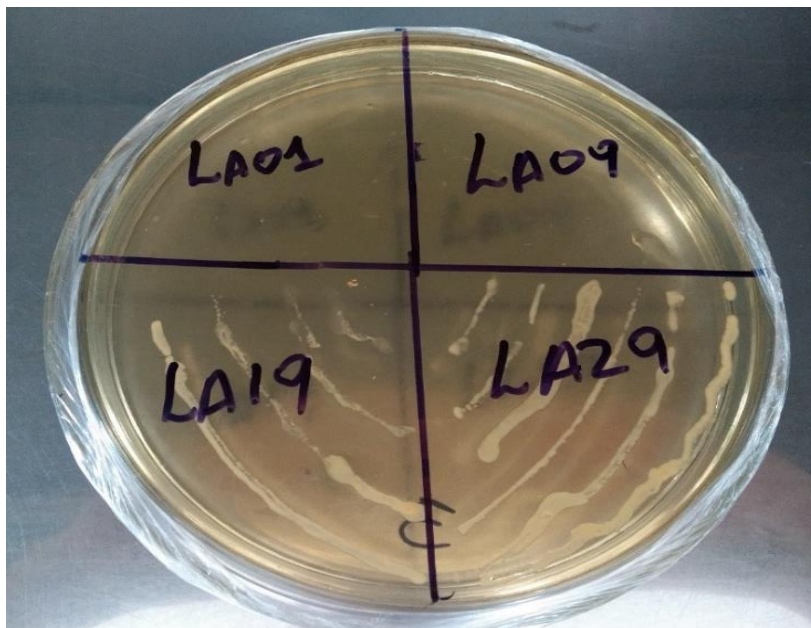
Fonte: Autor, 2020.

Temperaturas elevadas (40 °C) prejudicam o desenvolvimento das leveduras com a produção em excesso de etanol, levando à inibição das próprias leveduras. (ALEXANDRE e CHARPENTIER, 1998) Além disso, a elevação de temperatura provoca desordens na membrana, desnatura proteínas, inibe a glicólise e pode resultar em mutações ou até mesmo na morte da levedura. (AMORIM et al., 2001).

A tolerância a altas concentrações de glicose é outro parâmetro importante para o processo fermentativo. Quatro cepas foram testadas quanto a resistência a altas concentrações de glicose (LA01, LA09, LA19 E LA29). Nesse estudo foi testada apenas na concentração de 50% de glicose, uma vez, que o meio de isolamento já continha uma concentração elevada de glicose (30%), favorecendo as cepas mais resistentes.

Das quatro cepas testadas, apenas duas se mostraram tolerantes à concentração de 50% de glicose (LA19 e LA29). As cepas LA01 E LA09, não apresentaram crescimento e foram excluídas do teste (Figura 8).

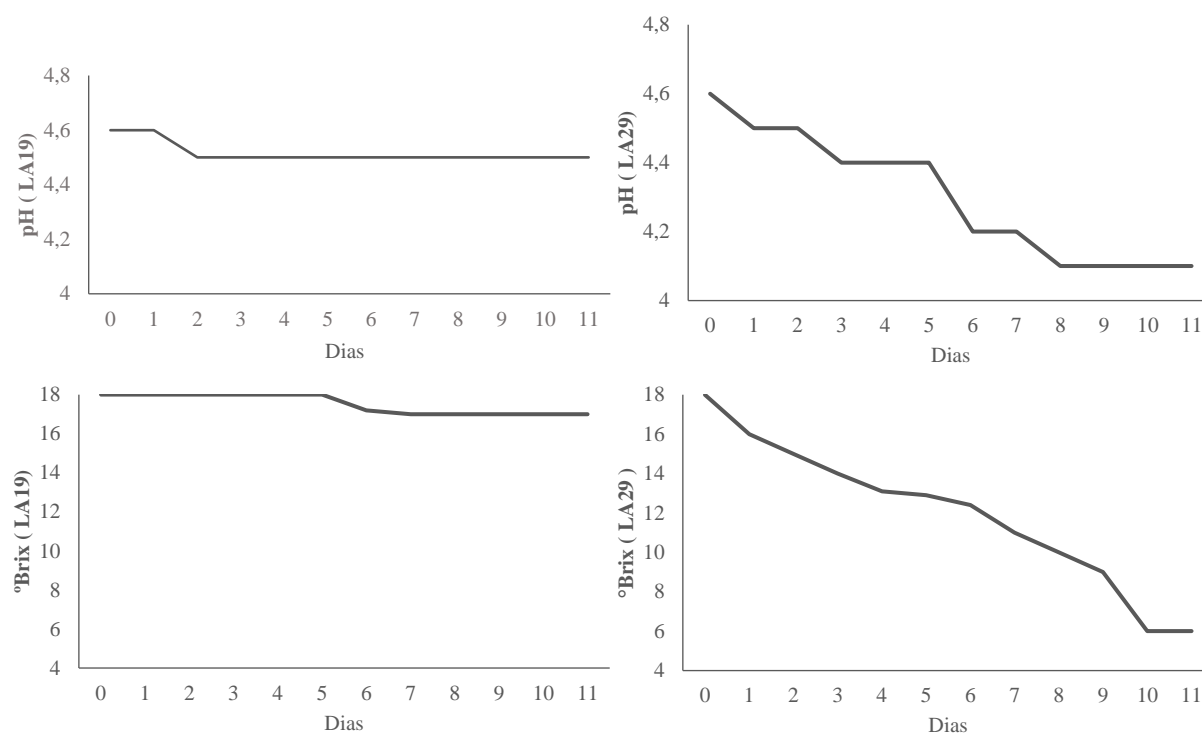
Figura 8- Teste tolerância das cepas a 50% de glicose.



Fonte: Autor, 2019.

Após o teste de seleção foi realizada uma microvinificação em laboratório com o objetivo de simular um processo fermentativo com as cepas selecionadas nos testes anteriores (LA19 E LA29). Durante a microvinificação foram dadas as mesmas condições de ° brix e pH para ambas as cepas. Iniciou-se o processo fermentativo com o pH nos valores de 4,6 e sólidos solúveis (°brix) apresentava valor de 18 nos dois mostos. O processo fermentativo foi avaliado durante 12 dias, período no qual os valores se estabilizaram. A figura 9 apresenta os resultados de pH e °brix durante a microvinificação em laboratório.

Figura 9- Valores de pH e °brix durante a microvinificação em laboratório.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 10. Dia 01 da microvinificação. Evidenciando a sedimentação e aparecimento de duas fases na LA19.



Fonte: Autor, 2020.

Durante o tempo de estudo, não foi observado sinais de fermentação no mosto na cepa LA19. Observou-se a divisão de fases ocorrente já no dia 01 após a inoculação, onde as partículas mais pesadas sedimentaram e assim permaneceu durante todo o processo (Figura 10). Também não foi observado redução significativa nos valores de pH e °brix.

Já a cepa LA29, apresentou formação de espuma e bolhas, sinais típicos do processo fermentativo, e redução nos valores de pH e °brix. No final do processo foi observado valores de 4,1 para o pH, e o °brix se estabilizou em 6 ao final dos 12 dias. O mosto se apresentou uniforme durante o processo, somente quando os valores estabilizaram que houve sedimentação e divisão de fases.

4 CONCLUSÕES

As leveduras selecionadas LA19 e LA29 apresentam propriedades enológicas importantes que atendem aos critérios e características apropriadas ao processo de produção de vinho, como tolerância ao etanol e alta temperatura, habilidade em tolerar e fermentar glicose, e a não produção excessiva de sulfeto de hidrogênio.

Apenas a cepa LA29 foi capaz de realizar fermentação alcoólica utilizando como substrato o abacaxi.

O abacaxi comprovou ser uma matéria-prima eficaz na produção de bebida alcoólica fermentada, quando se utiliza leveduras selvagens.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, V. D. C.; MENEZES, E. G. T. Vinho de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck): um estudo com diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, p. 780–785, 2017.

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hamp. Shire, v. 20, n. 1, p. 20-27, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900442>.

AMORIM, H. V.; LIMA, U. A.; BASSO, L. C. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, v. 3, 2001.

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos, SP, Brasil, 2004.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Ed. Edgarg Blücher Ltda, v. 5., p. 1-43, 2001.

ARAÚJO, K. G. L.; SABAA-SRUR, A. U. O.; RODRIGUES, F. S.; MANHÃES, L. R. T.; CANTO, M. W. Utilização de abacaxi (*Ananas comosus* L.) cv. Pérola e Smooth cayenne para a produção de vinhos - estudo da composição química e aceitabilidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 29, n 1, p. 56-61. 2009.

ASQUIERI, E. R.; SILVA, A. G. de M.; CANDIDO, M. A. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 896-904, 2009.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v.26, p. 89–105, 2008.

BARBOSA, E. A. et al. Quality improvement and geographical indication of cachaça (Brazilian spirit) by using locally selected yeasts strains. **Journal of Applied Microbiology**. DOI: 10.1111/jam.13216. 2016.

BARNABÉ, D.; GUERRA, C. C.; VENTURINI-FILHO, W.G. **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011.

Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 31, p. 227-236, 2013.

BRASIL. **Portaria n. 64 de 23 de abril de 2008**. Aprovam os regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas: fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008.

BRASIL. **Decreto nº 6.871 de 04 de Junho de 2009**. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, 2009.

BUENO-NETO, Celso Lelis. **Influência da concentração inicial de células e do tempo de enchimento da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melão de cana-de-açúcar**. 1982. Dissertação (Mestrado em Química)- Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

CALDAS, Celso; BORÉN, Aluizio; SANTOS, Fernando. **Cana-de-açúcar_Bioenergia,Açúcar e Etanol: Tecnologias e Perspectivas**. 2. ed. Viçosa: UERGS, 2012. 637p.

CALLEJON, R.M.; CLAVIJO, A.; ORTIGUEIRA, P.; TRANCOSO, A.M.; PANEQUE, P.; MORALES, M.L. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different

selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Analytica Chimica Acta**, v.660, p. 68-75, 2010.

CARDOSO, M. das G. Produção de Aguardente de Cana. 2.ed. Lavras: UFLA, 445p, 2006.

CARRASOCO, P.; QUEROL, A. DEL OLMO, M. Analysis os the resistance of comercial wine yeast strains. **Archives in Microbiology**. v. 175, p. 450-457, 2001.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Compêndio de Estudos Conab**. Disponível em: file:///C:/Users/pc/Downloads/Compendio_de_Estudos_da_Conab_-_V.24_-_A_Participacao_do_Abacaxi_no_Desenvolvimento_Economico_nas_Regioes_Produtoras%20(1).pdf, acesso em: 01 dez. 2020.

CHI, Z.; AMEBORG, N. *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. **Journal of industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 75-78, 2000. CNPEM. Disponível em: <http://cnpem.br/fermentacao-continua-ou-em-batelada>, acesso em: 21 Nov. 2019.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química nova**, v. 24, p. 449-452, 2001.

CRUZ C. D.; CARNEIRO P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, 585p, 2006.

CRUZ, C. D. **Programa GENES**: Biometria: Versão windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2008.

DAMATTO JUNIOR, E. R.; GOTO, R.; RODRIGUES, D. S.; VICENTINI, N. M.; CAMPOS, A. J. Qualidade de pimentões amarelos colhidos em dois estádios de maturação. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v.17, n.1, p.23-30, 2010.

DELLACASSA, E.; TRENCHS, O.; FARINA, L.; DEBERNARDIS, F.; PEREZ, G.; BOIDO, E.; CARRAU, F. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) wine production in Angola: Characterization of volatile aroma compounds and yeast native flora. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 161–167, 2017.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de Fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 342-350, 2013.

DIAS, D. R.; PANTOJA, L.; SANTOS A. S.; SCHWAN, R. F. Fermentado de frutas. In. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. ed. Waldemar gastoni Venturini filho. 2 ed. São Paulo: Bucher, 2016.

DRUMONDE-NEVES, J.; VIEIRA, E.; LIMA, M. T.; ARAUJO, I.; CASAL, M.; SCHULLER, D. An easy, quick and cheap high-throughput method for yeast DNA extraction from microwell plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, p. 206-208, 2013.

ESTEVE-ZARZOZO, B.; GOSTINCAR, A.; BOBET, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the “El Penedez” area (Spain). **Food Microbiology**, v. 17, p. 553-562, 2000.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Faostat**. Rome, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>, acesso em: 28 set 2018.

FERREIRA, E. **Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada**. 2005. Dissertação. Universidade de Campinas, São Paulo, 2005.

FONTAN, R. C. I.; VERÍSSIMO, L. A. A.; SILVA, W. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M. Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, p. 203-210, 2011.

GONÇALVES, S. S. ANDRADE, J. S. SOUSA, R. S. et al. Influência do branqueamento nas características físico-químicas e sensoriais do abacaxi desidratado. **Revista de Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 21, n. 4, p. 651-657, 2010.

GONÇALVEZ, C. L. **Uso de levedura selecionada em escala piloto para a produção de cachaça de alambique**. Feira de Santana, 2015. 118f. Tese (Doutorado em biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana.

GONZÁLEZ, A., COULSON, M.; BRETTELL, R. Development of DNA markers (ISSRs) in mango. **Acta Horticulturae**, v. 575, p. 139-143, 2002.

GUIMARÃES, Thais Martins. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho**. 2005. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HOSSAIN, F. World pineapple production: An overview. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 16, p. 11443–11456, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal**. 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado>. Acesso em 25 nov. 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Analytical Standards of the Adolfo Lutz Institute: Chemical and Physical Methods for Food Analysis**, 4th ed. São Paulo: IAL, 2008.

IZAWA, S., IKEDA, K.; MIKI, T.; WAKAI, Y.; INOUE, Y. Vacuolar morphology of *Saccharomyces cerevisiae* during the process of wine making and Japanese sake brewing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 277-282, 2010.

LIM, H. C.; SHIN, H. S. **Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactor**, 1. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo - SP, Blucher, v. 3, 593p., 2001.

LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. v. 4. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. 593p.

LIMA, Anny. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para o processo de fermentação alcoólica: O Estado da Arte**. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior - ABEAS - v.24, n.1, p.7-12, 2009. Disponível em: http://www.abeas.com.br/wt/files/3_2009_1.pdf. Acesso em: 25 nov. 2020.

LOBO, M.G; PAULL, R.E. **Handbook of pineapple technology: Production, postharvest science, processing and nutrition**, 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2017.

LOPES, R. DE V. V.; SILVA, F. L. H. DA. Elaboração de fermentados a partir do figo-da-índia. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, p. 305–315, 2006.

LOPES, C.A.; RODRÍGUEZ, M.E.; SANGORRÍN, M.; QUEROL, A.; CABALLERO, A.C. Patagonian wines: the selection of na indigenous yeast starter. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p. 539-546, 2007.

LOPES, M.L.; PAULILLO, S. C.L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A. LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, 64-76, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S; BUKLE, D.H; STHAL, D.A. **Microbiologia de Brock**, 14. ed. São Paulo: Artmed, 2016.

MANETTI, L.M. Metabólitos Secundários da Família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885-1897, 2009.

MARTINS, L. P.; SILVA, S. DE M.; SILVA, A. P. DA; CUNHA, G. A. P. DA; MENDONÇA, R. M. N.; VILAR, L. DA C.; MASCENA, J.; LACERDA, J. T. Conservação pós-colheita de abacaxi «Pérola» produzido em sistemas convencional e integrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 695–703, 2012.

MORAES, F.V, **Como controlar a qualidade da cachaça**. Engarrafador moderno. LK Editora, v.10, São Paulo, 2001.

MOREIRA, C.S.; SANTOS, M. S. M.; BARROS, N. S.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOLE, M. **Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol**. Ciência e Natura, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 55-63, 2015.

MULAMBA, N. N; MOCK, J. J. Melhoramento do potencial de rendimento do método Eto Blanco (*Zea mays* L.) população por cruzamento para características de plantas. **Revista Egípcia de Genética e Citologia**, v. 7, p. 40-51, 1978.

NASCIMENTO FILHO, W. B; FRANCO, C. R. Avaliação do Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v.7, n.6, p.1968- 1987, 2015.

NETO, L; MENDES-FERREIRA, A.A. Pesquisa de atividade sulfito redutase em leveduras de origem enológica. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 24, n.2, p. 275-278, 2005.

OLIVA-NETO, P. de. Efeito de Fatores Inibidores na Fermentação Alcoólica. Produção de Etanol: Qualidade Engenharia/Engineering 107. FAZU, Uberaba, n. 8, p. 100-107, 2011.

OLIVEIRA, Evelyn de Souza. **Características fermentativas, formação de compostos voláteis e qualidade da aguardente de cana obtida por linhagens de leveduras isoladas de destilarias artesanais**. Tese (Programa de Pós-graduação em Tecnologia de alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2001.

OLIVEIRA, J. A. R.; CARVALHO, A. V.; MARTINS, L.H.S.; MOREIRA, D. K. T. Elaboração e caracterização físico-química e sensorial de estruturas de polpa concentrada de abacaxi. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.23, p. 23-31, 2012.

OLIVEIRA, L. A., LORDELO, F. S., TAVARES, T. Q., CAZETTA, M. L. Elaboração de Bebida Fermentada Utilizando Calda Residual da Desidratação Osmótica de Abacaxi (Ananas comosus L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 6, n° 01, p. 702-712, 2015.

PARENTE G. D. L.; ALMEIDA, M. M; SILVA, J. L.; SILVA, C. G.; ALVES, M. F. Cinética da produção do fermentado alcoólico de abacaxi ‘pérola’ e caracterização da bebida. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Mossoró, v 9, n. 2, p. 230 - 247, 2014.

PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 1-9, 2000.

PINA, C.; SANTOS, C.; COUTO, J.A.; HOGG, T. Ethanol tolerance of five non*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. **Food Microbiology**, 21, p. 439-447, 2004.

PINO, J. A.; QUERIS, O. Analysis of volatile compounds of pineapple wine using solid-phase microextraction techniques. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1241–1246, 2010.

Processo Industrial no setor sucroalcooleiro. Disponível em:
<http://pimartins.weebly.com/fermentaccedilatildeo.html>, acesso em: 26 nov. 2020.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RIBEIRO, C.A.F.; HORII, J. Potencialidades d linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v. 56, 2002.

RODA, A.; LUCINI, L.; TORCHIO, F.; DORDONI, R.; FAVERI, D. M. L. M. Metabolite profiling and volatiles of pineapple wine and vinegar obtained from pineapple waste. **Food Chemistry**, v. 229, p. 734–742, 2017.

SHANKAR, T.; THANGAMATHI, P.; RAMA, R.; SIVAKUMAR, T. Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 170. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 13, p. 1386-1393, 2014.

SILVA, M. A. A. A. da; SILVA, G. A. da; **Leveduras nacionais selecionadas para a elaboração de vinho**. Circular Técnica- Embrapa Uva e Vinho, n.14, 1987.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B. dos.; RESENDE, A. do. M.; MORAIS, J. O. F. de.; MORAIS-JUNIOR, M. A. de; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 88, p. 13–23, 2005. DOI: 10.1007 / s10482-004-7283-8.

SILVA J. L. A.; DANTAS D. L. L.; GASPARETO O. C. P.; FILHO R. S. F. Elaboração e caracterização físico-química de fermentado alcoólico de abacaxi. **Holos**, v. 3, p 108-118. 2010.

SILVA, J. L. A. DA; DANTAS, C. E. A. Fermentado Alcoólico De Umbu: Produção, Cinética De Fermentação E Caracterização Físico-Química. **Holos**, v. 2, p. 108, 2017.

SOUZA, Crisla Serra. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, 2009.

SOUZA, Vander Felipe de. **Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de sorgo sacarino**. 2011. 63f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido)- Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, Minas Gerais, 2011.

STECKELBERG, Claudia. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. Tese (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, São Paulo, 2001.

TERRES, L. R.; LENZ, E.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. S. Estimativas de ganhos genéticos por diferentes índices de seleção em três populações híbridas de batata. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 305–310, 2015.

THÉ, P. M. P.; NUNES, R. P.; MOREIRA, S. L. I. M.; ARAÚJO, B. M. DE. Características Físicas, Físico-Químicas, Químicas E Atividade Enzimática De Abacaxi Cv. *Smooth Cayenne* Recém Colhido. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, p. 273–281, 2010.

TORRES-NETO, A. B.; SILVA, M. E.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H. Cinética e Caracterização Físico-Química do Fermentado do Pseudofruto do Caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**, Vol. 29, p. 489-492. 2006.

UGLIANO, M.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P. A. Occurrence of hydrogen sulfide in wine and in fermentation: influence of yeast strain and supplementation of yeast available nitrogen. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p. 423-429, 2009.

VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 2.ed. São Paulo: Editora Blucher, 2016.

VENTURINI FILHO, W.G.; BRUNELLI, L. T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T.; NOVAES, F.V. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcóolica. **Digital Library of Journals**, v. 31, n. 2, p. 227-236 2013.

VIANA, N. C. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de fermentação alcoólica**. Piracicaba, 2017. Dissertação (Mestrado em ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

ZABED, H.; FARUQ, G.; SAHU, J. N.; AZIRUN, M. S.; HASHIM, R.; NASRULHAQ BOYCE, A. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The Scientific World Journal**, v.2014; p.1-11, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/957102>.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Yeast flocculation: new story in fuel ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 849-856, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.006>.

ZUZUARREGUI, A.; OLMO, M. Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behavior. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 699-710, 2004.

APENDICE A- Tabela com a análise de fermentação da glicose

FERMENTAÇÃO DE GLICOSE				
ISOLADOS	DIA 01	DIA 02	DIA 03	DIA 04
LA01	+++	+++	+++	+++
LA02	-	+++	+++	+++
LA03	-	+	+++	+++
LA04	-	+	+++	+++
LA05	-	+++	+++	+++
LA06	+++	+++	+++	+++
LA07	+++	+++	+++	+++
LA08	+++	+++	+++	+++
LA09	+++	+++	+++	+++
LA10	++	++	+++	+++
LA11	+++	+++	+++	+++
LA12	+++	+++	+++	+++
LA13	+++	+++	+++	+++
LA14	+++	+++	+++	+++
LA15	-	++	+++	+++
LA16	-	+++	+++	+++
LA17	+	+++	+++	+++
LA18	+++	+++	+++	+++
LA19	+++	+++	+++	+++
LA20	+++	+++	+++	+++
LA21	+	++	+++	+++
LA22	+++	+++	+++	+++
LA23	-	+	+++	+++
LA24	-	+	+++	+++
LA25	-	++	+++	+++
LA26	+	++	+++	+++
LA27	-	++	+++	+++

LA28	+	+++	+++	+++
LA29	+++	+++	+++	+++
LA30	-	+++	+++	+++
LA31	-	++	+++	+++
LA32	-	-	+	++
LA33	+++	+++	+++	+++
LA34	+++	+++	+++	+++
LA35	++	+++	+++	+++
LA36	+	+++	+++	+++
LA37	++	+++	+++	+++
LA38	+	+++	+++	+++
LA39	-	+	++	+++
LA40	+	+++	+++	+++
LA41	+++	+++	+++	+++
LA42	+++	+++	+++	+++
LA43	+++	+++	+++	+++
LA44	+++	+++	+++	+++
LA45	++	+++	+++	+++
LA46	-	+	++	++
LA47	+++	+++	+++	+++
LA48	-	++	+++	+++
LA49	-	++	+++	+++
LA50	++	+++	+++	+++
LA51	-	+	+++	+++
LA52	-	+	+++	+++
LA53	-	++	+++	+++
LA54	++	+++	+++	+++
LA55	-	++	+++	+++
LA56	-	-	+++	+++
LA57	-	-	++	+++
LA58	-	-	+++	+++

LA59	-	-	+++	+++
LA60	-	+	+++	+++
LA61	-	-	+++	+++
LA62	-	-	+	++
LA63	-	-	-	-
LA64	-	-	+++	+++
LA65	-	+	+++	+++
LA66	-	-	+	+++
LA67	-	+	+++	+++
LA68	-	-	-	+
LA69	-	-	++	++
LA70	-	-	+	++
LA71	-	+	+++	+++
LA72	-	+	+++	+++
LA73	-	-	+++	+++
LA74	-	-	++	+++
LA75	-	-	+++	+++
LA76	-	+	+++	+++
LA77	-	-	+++	+++
LA78	-	+	+++	+++
LA79	-	-	+++	+++
LA80	-	-	+++	+++
LA81	-	-	++	+++
LA82	-	-	-	-
LA83	-	-	-	++
LA84	-	-	-	+
LA85	-	-	-	++
LA86	-	-	+	+++
LA87	-	-	-	+++
LA88	-	-	-	++
LA89	-	-	++	+++

LA90	-	-	-	++
LA91	-	-	-	+++
LA92	-	-	-	+
LA93	-	-	-	++
LA94	-	-	++	+++
LA95	-	-	+	+++
LA96	-	-	+	+++
LA97	-	-	-	+
LA98	-	-	+	+++
LA99	-	-	++	+++
LA100	-	-	-	+++
LA101	-	-	-	-
LA102	-	-	-	++
LA103	-	-	++	+++
LA104	-	-	-	+
LA105	-	-	-	+++
LA106	-	-	-	+++
LA107	-	-	-	+++
LA108	-	-	+	+++
LA109	-	-	+	++
LA110	-	-	+++	+++
LA111	-	-	-	+++
LA112	-	-	-	+++
LA113	-	-	++	+++
LA114	-	-	+	+++
LA115	-	-	+	+++
LA116	-	-	+	+++
LA117	-	-	+	+++
LA118	-	-	-	++
LA119	-	-	+	+++
LA120	-	-	-	+++
